

УДК 612.115:616.15

Степанов А.В., Краденов А.В.
ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ ФИБРИНОЛИЗ В ТРОМБОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. В работе представлены данные по повышению фибринолитической активности нейтрофилов. Стрептаза повышает фибринолитическую активность нейтрофилов более чем в 3 раза. Добавление конканавалин А приводит к сохранению высокого тромболитического потенциала. Нейтрофилы активно адгезируются к фибрину. Обработка фибрина интактной сывороткой значительно подавляет данный процесс. Сенсibilизация фибрина моноклональными антителами увеличивает их адгезивную способность. Мы предполагаем, что лейкоцитарный фибринолиз может найти свое место в клинической практике. Его стоит использовать при неэффективности внутривенного тромболитика.

Ключевые слова: тромбоз, фибринолиз, нейтрофилы.

Stepanov A.V., Kradenov A.V.

LEUKOCYTIC FIBRINOLYSIS IN THROMBOLYTIC THERAPY

Summary. In work increase of fibrinolytic activity of neutrophils is shown. Streptasum increases fibrinolytic activity of neutrophils more than by 3 times. Addition leads concanavalin A to preservation of high thrombolytic potential. Neutrophils actively stick to fibrin. Fibrin processing by intact serum considerably suppresses this process. The fibrin sensitization monoclonal antibodies increases their adhesive ability. We assume that the leukocytic fibrinolysis can find the place in clinical practice. It should be used at an inefficiency of an intravenous thrombolysis.

Keywords: thrombosis, fibrinolysis, neutrophils.

Введение. В настоящее время основной причиной смертности в различных странах мира являются различные сердечно-сосудистые заболевания: инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоэмболия легочной артерии и другие. Одним из основных методов лечения является проведение лизиса тромбов в сосудах. Однако тромболитическая терапия у части пациентов может быть не всегда эффективна. Это связано с тем, что в сосуде, где располагается тромб, или нет кровотока, или же он резко снижен. Поэтому введение тромболитических агентов в сосудистое русло не может быть достаточно результативным, так как тромболитик не может достичь тромба. Другим недостатком данного вида терапии является то, что для достижения положительного эффекта лекарственные препараты приходится вводить в достаточно высоких концентрациях. Причем существенная часть фибринолитика блокируется многочисленными ингибиторами крови, и клиницист не всегда знает уровень этого потенциала, который может существенно отличаться у различных больных. Фибринолитическая терапия может сопровождаться различными осложнениями: кровотечения, развитие инсульта, аллергические реакции и другие [5].

Перспективным была бы доставка тромболитика к тромбу с помощью собственных клеток, например, нейтрофилов. В последние годы появляется все больше данных, что при некоторых патологических состояниях лейкоцитарный фибринолиз играет весьма важную роль. Установлена его ключевая роль в нарушении фибринолиза при сепсисе [15], при ДВС-синдроме [3], при кардиоваскулярных заболеваниях [14]. Показано также, что внутривенный тромболитик более эффективен при высокой активности и большем количестве нейтрофилов в крови [13]. Нами предложен способ активации лейкоцитов, который может быть применен и для повышения их фибринолитической активности [1]. В других исследованиях установлено, что некоторые синтетические пептиды могут напрямую регулировать лейкоцитарный фибринолиз [9], или же воздействовать на гранулоциты через активацию лимфоцитов [10, 11] и макрофагов [8]. Важную роль клеточный фибринолиз играет и у онкологических больных [6, 7].

Цель исследования – изучить возможность повышения фибринолитической активности нейтрофилов, изменение их адгезивных свойств и в перспективе рассмотреть варианты более эффективного проведения тромболитической терапии и снижения количества её побочных эффектов.

Для решения этой цели необходимо выполнить несколько задач: во-первых, дополнительно нагрузить нейтрофилы тромболитиками для усиления их фибринолитической активности, во-вторых, повысить тропность нейтрофилов к фибрину, и в третьих, реализовать выброс тромболитика из клеток в определенном месте при контакте с тромбом. В данной работе мы пытаемся обозначить лишь несколько из этих задач.

Методика исследования: Во всех экспериментах использовали нейтрофилы, выделенные из венозной гепаринизированной крови по стандартной методике на градиенте плотности фикал-верографин. Для определения фибринолитической активности клеток, лейкоцитарную взвесь инкубировали на фибрине в течение 2 часов, который формировали на дне плоскодонного планшета. После чего отбирали пробы супернатанта с последующим определением продуктов деградации фибрина иммуноферментным методом. Фибринолитическую активность клеток выражали в мкг продуктов деградации фибрина (ПДФ) в супернатанте [2]. Исследования проводили на крови 18 здоровых доноров. Каждую взвесь нейтрофилов использовали в 4 сериях экспериментов.

Степень адгезии нейтрофилов к поверхности фибринового геля оценивали через 1 час инкубации клеточной суспензии в лунках плоскодонного полистеролового планшета, покрытых слоем фибрина. После удаления не прилипших клеток, лунки отмывали культуральной средой. Затем проводили фиксацию метанолом 10 минут и окрашивали по Романовскому. Адгезивность клеток определяли при увеличении $\times 150$ раз по их количеству в единице площади окулярной сетки микроскопа в 5 квадратах, установленных методом случайного отбора. В контрольных исследованиях использовали интактную сыворотку человека. В эксперименте применяли моноклональные антитела к фибрину – RANFbn. Обработку антителами фибринового геля проводили в течение 1 часа.

Полученные данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica, версия 6,0. При сравнении групп использовался критерий Манна-Уитни. Числовые данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала. Различия между сравниваемыми вариационными рядами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. В первой серии экспериментов изучали фибринолитическую активность нейтрофилов при обработки их различными стимуляторами. Установлено, что стрептаза повышает фибринолитическую активность почти в 3 раза, а другой известный стимулятор фагоцитоза продигиозан – в 2 раза (таблица 1).

Таким образом, стимуляторы нейтрофилов существенно повышают их фибринолитическую активность.

Однако в дальнейшем было установлено, что без дополнительной обработки нейтрофилы, стимулированные стрептазой, быстро теряют свой фибринолитический потенциал. Так, через 30 минут фибринолитическое действие их снижается более чем вдвое. Из большого количества исследуемых нами соединений наиболее интересный эффект проявил конканавалин А. Добавление его во время инкубации клеток с фибринолитиком приводило к сохранению высокого тромболитического потенциала (таблица 2).

Таблица 1

Влияние различных стимуляторов на фибринолитическую активность нейтрофилов, Me (25-75 процентиль).

Показатели N=48	Интактные лейкоциты (контроль)	Лейкоциты, активированные стрептазой (опыт 1)	Лейкоциты, активированные продигиозаном (опыт 2)
Концентрация ПДФ, мкг/мл	1,77 (1,54-1,98)	5,45 (4,96-5,76) *	3,56 (3,21-3,85)*

* – статистически значимые различия между опытной и контрольной группами.

Таблица 2

Влияние конканавалина А на изменение фибринолитической активности гранулоцитов, Ме (25-75 перцентиль).

Показатели N=54	Лейкоциты, активированные стрептазой (контроль)	Лейкоциты, активированные стрептазой, через 30 минут (опыт 1)	Лейкоциты, активированные стрептазой и конканавалином А, через 30 минут (опыт 2)
Концентрация ПДФ, мкг/мл	5,45 (4,96-5,76)	2,42 (2,06-2,74) *	4,96 (4,57-5,32)

* – статистически значимые различия между опытной и контрольной группами.

В другой серии экспериментов мы постарались повысить тропность нейтрофилов к фибрину.

Установлено, что нейтрофилы активно адгезируются к интактному фибрину если находятся в культуральной среде. Обработка же фибрина интактной сывороткой значительно подавляет данный процесс (в 8,9 раза). Очевидно сывороточные белки за счет неспецифической адсорбции «маскируют» поверхность фибринового геля и ослабляют его адгезивные свойства. Эти результаты согласуются с литературными данными [12]. Сенсбилизация же фибрина моноклональными антителами резко увеличивает адгезивную способность нейтрофилов (таблица 3).

Таблица 3

Количество гранулоцитов, адгезированных к интактному и сенсбилизированному антителами фибринового гелю, Ме (25-75 перцентиль).

Обработка фибрина N=54	Физиол. раствором (контроль)	Контрольная сыворотка (опыт 1)	Обработка фибрина моноклональными антителами к фибрину (опыт 2)
Количество нейтрофилов	68,5 (62,8-72,6)	7,8 (4,7-9,9) *	913,4 (875,2-944,1) *

* – статистически значимые различия между опытной и контрольной группами

На основании полученных данных можно заключить, что значительное усиление адгезивности нейтрофилов происходит, возможно, за счет взаимодействия Fc-рецепторов клеток с Fc-фрагментами антител, покрывающих слой фибрина. Такая ситуация, когда нейтрофилы реагируют с комплексом антиген-антитело, обязательно влечет за собой высвобождение содержимого лизосом в окружающее пространство [4].

Предполагается, что введение собственных нагруженных нейтрофилов приведет к их накоплению в районе тромба. Известно, что эти клетки способны самостоятельно перемещаться в ткани, поэтому они не зависят от наличия или отсутствия кровотока. При взаимодействии антифибриновых антител с тромбом происходила активация нейтрофилов и выброс как собственных ферментов, так и гранул с тромболитиками, которыми мы их нагрузили. Причем доза фибринолитика, используемая для лечения, будет на порядок меньше, чем при проведении стандартной методики его введения.

Мы надеемся, что эти исследования немного приблизят момент, когда лейкоцитарный фибринолиз сможет найти свое место в клинической практике. Возможно, его стоит рекомендовать при неэффективности внутривенной тромболитической терапии.

Литература.

1. А.С. №1689855, СССР, МПК G 01 N 33/48. Способ активации лейкоцитов крови человека / А.В. Краденов, А.В. Степанов ; заявитель Читинский государственный медицинский институт. - №4709579 ; заявл. 26.06.89 ; опубл. 07.11.91, Бюл. №41. – 3 с.

2. А.С. №1704078, СССР, МПК G 01 N 33/48. Способ определения фибринолитической активности лейкоцитов / А.В.Степанов, А.В.Краденов, Н.Н.Цыбиков; заявитель Читинский государственный медицинский институт. - №4697310 ; заявл. 01.06.89 ; опубл. 07.01.92, Бюл. №1. – 3 с.
3. Боярчук Е. Д. Изменение содержания гранул лизосомальных катионных белков в гранулоцитах при формировании ДВС-синдрома / Е. Д. Боярчук // Вісник ЛНУ імені Тараса Шевченка. – 2010. – № 21 (208). – С. 22-26.
4. Кузник Б. И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник. – Чита : Экспресс издательство, 2010. – 827 с.
5. Марков В.А. Тромболитическая терапия при инфаркте миокарда / В.А.Марков, Е.В. Вышлов. – Томск: СТТ, 2011. – 128 с.
6. Мельникова С.Л. Лейкоцитарный фибринолиз у онкологических больных / С.Л. Мельникова, А.В. Степанов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3-1. – С. 117-120.
7. Перспективы использования нового регулятора гуморального иммунитета в онкологии / А.В. Степанов [и др.] // Забайкальский медицинский вестник [Электронный ресурс] – 2013. – № 1. – С. 125-129. Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv>
8. Степанов А.В. Влияние синтетических пептидов сумки Фабрициуса на функциональную активность макрофагов / А.В. Степанов, В.Л.Цепелев // Забайкальский медицинский вестник [Электронный ресурс]. – 2014. – № 2. – С. 44-47. Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv>
9. Степанов А.В. Пептидные регуляторы гуморального иммунитета / А.В.Степанов, В.Л.Цепелев, С.Л.Цепелев. – Чита : Книжное изд-во "Поиск", 2002. – 180 с.
10. Степанов А.В. Результаты исследования эффективности синтетического иммуностимулятора нового поколения / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Цепелев. // Фундаментальные исследования. – 2012. – №12 (1). – С.167-169.
11. Степанов А.В. Иммуностимулятор из центрального органа гуморального иммунитета — сумки Фабрициуса / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Мельникова // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – №2. – С. 32-34.
12. Lishko V. K. Plasminogen on the surfaces of fibrin clots prevents adhesion of leukocytes and platelets / V. K. Lishko, I. S. Yermolenko, T. P. Ugarova // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2010. – V. 8. – P. 799–807.
13. Leukocytes May Have 2 Opposing Effects in Intravenous rtPA Treatment for Ischemic Stroke / E. Nomura [et al.] // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2012. – № 11. – P. 571-576.
14. Leukocytes and the Natural History of Deep Vein Thrombosis / P. Saha [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology – 2011. – № 31 – P. 506-512.
15. Wohner N. Role of Cellular Elements in Thrombus Formation and Dissolution / N. Wohner // Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry. – 2008. – № 6 – P. 224-228.